

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018923

International filing date: 17 December 2004 (17.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-419921
Filing date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

18.01.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 2 月 1 7 日

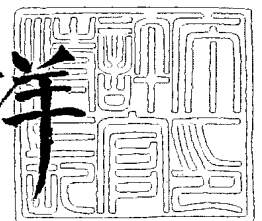
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 4 1 9 9 2 1
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 1 9 9 2 1]

出 願 人
Applicant(s): 山内 芳雄
新川 孝志
磯辺 俊明

2 0 0 4 年 1 1 月 1 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 058-07
【提出日】 平成15年12月17日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/68
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都日野市東豊田 3 - 2 2 - 1 3 豊田第二コーポラス 4 0 3
 【氏名】 山内 芳雄
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都八王子市下柚木 1 2 - 8 8
 【氏名】 新川 孝志
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都八王子市みなみ野 5 - 6 - 7
 【氏名】 礒辺 俊明
【特許出願人】
 【識別番号】 301060163
 【氏名又は名称】 山内 芳雄
【特許出願人】
 【住所又は居所】 東京都八王子市下柚木 1 2 - 8 8
 【氏名又は名称】 新川 孝志
【特許出願人】
 【識別番号】 301060174
 【氏名又は名称】 礒辺 俊明
【代理人】
 【識別番号】 100092901
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 岩橋 祐司
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015576
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

質量分析計を用い、2種のタンパク質含有試料を対比して、それぞれの試料に含まれるタンパク質の同定及びそれぞれの試料に含まれる同種のタンパク質の量比を解析するタンパク質解析方法において、

前記2種のタンパク質含有試料をそれぞれ制限酵素により特定アミノ酸部位で切断し、ペプチド鎖含有試料とする工程と、

同位体により異なる質量差を有する標識化合物を前記それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれるペプチド鎖に修飾し、それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれる同種のペプチド鎖に質量差を与える工程と、

各同位体標識したペプチド鎖含有試料を混合し、該混合試料を各ペプチド鎖毎に分別定量してMSスペクトルを測定し、同位体標識によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖について含有量比を求める工程と、

前記MSスペクトルを参照して、各ペプチド鎖からアミノ酸配列を特定すべきペプチド鎖を選択し、該ペプチド鎖から生成されるプロダクトイオンの質量スペクトルによって、該ペプチド鎖のアミノ酸配列を定性する工程と、

前記ペプチド鎖のアミノ酸配列に基づき、既知DNA配列より対応するタンパク質を特定する工程と、

前記同位体修飾したペプチド鎖の質量差による分別定量値に基づいて、前記特定したタンパク質の前記各タンパク質含有試料に含まれる含有量の比を求める工程と、を含むことを特徴とするタンパク質解析方法。

【請求項 2】

請求項1に記載のタンパク質解析方法において、

前記標識化合物としてO-メチル-イソウレアとその安定同位体を用いたことを特徴とするタンパク質解析方法。

【請求項 3】

請求項2に記載のタンパク質解析方法において、

前記同種のペプチド鎖の含有量比を求める工程で、前記修飾化合物によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖の2つのMSスペクトルのピークを比較する際に、天然に存在する同位体元素によるペプチド鎖の同位体ピークとの重なりを除去して定量比の補正をすることを特徴とするタンパク質解析方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】タンパク質解析方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質の解析方法、特にタンデム型の質量分析計を用いた解析方法の改良に関する。

【背景技術】

【0002】

近年のゲノムプロジェクトのような遺伝子情報の解析プロジェクトの進展に伴い明らかにされた膨大な遺伝子情報と、細胞内で複雑に相互作用している多様なタンパク質との関連を明らかにすることにより、遺伝子の機能解析を進めていくことが求められている。プロテオーム解析は、細胞の機能を支える多様なタンパク質の関係を総合的にとらえようとする試みである。しかし現在の分析技術では、タンパク質の解析には多大な時間と労力が必要とされており、このように多様性に富むタンパク質の集合であるプロテオームの変化を、総合的に、しかも迅速に把握することが求められている。

従来タンパク質の分離分析として一般的に行われている電気泳動法では、高い分離能で分離できる一方で、自動化が困難で再現性や定量性の確保が難しいという問題があった。

そのため、近年、液体クロマトグラフと質量分析計、データ解析システムを結合し、試料の分離からタンパク質の同定に至る過程を一貫して自動的に行う大規模なタンパク質同定システムが開発されている。

【特許文献1】特開 2003-107066 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

また、正常状態と疾病状態の間における、細胞タンパク質の量の変化や、発生中の組織、病気になった組織、または遺伝的に変異した組織で発現するタンパク質の量を観察するための需要が高まっている。つまり、細胞内のタンパク質の同定だけでなく、タンパク質の量といった定量情報も同時に求められている。

そのため、I C A T (登録商標) 試薬を用いた試料間の定量比較が広く行われている (例えば、特許文献1 参照)。しかし、この I C A T (登録商標) 法では、前処理操作が煩雑であるという問題があった。

本発明は、上記課題に鑑みなされたものであり、その目的はタンパク質の同定及びその定量情報をより簡単な処理で得ることのできるタンパク質解析方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0004】

上記目的を達成するために、本発明のタンパク質解析方法は、質量分析計を用い、2種のタンパク質含有試料を対比して、それぞれの試料に含まれるタンパク質の同定及びそれぞれの試料に含まれる同種のタンパク質の量比を解析するタンパク質解析方法において、前記2種のタンパク質含有試料をそれぞれ制限酵素により特定アミノ酸部位で切断し、ペプチド鎖含有試料とする工程と、同位体により異なる質量差を有する標識化合物を前記それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれるペプチド鎖に修飾し、それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれる同種のペプチド鎖に質量差を与える工程と、各同位体標識したペプチド鎖含有試料を混合し、該混合試料を各ペプチド鎖毎に分別定量してMSスペクトルを測定し、同位体標識によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖について含有量比を求める工程と、前記MSスペクトルを参照して、各ペプチド鎖からアミノ酸配列を特定すべきペプチド鎖を選択し、該ペプチド鎖から生成されるプロダクトイオンの質量スペクトルによって、該ペプチド鎖のアミノ酸配列を定性する工程と、前記ペプチド鎖のアミノ酸配列に基づき、既知DNA配列より対応するタンパク質を特定する工程と、前記同位体修飾したペプチド鎖の質量差による分別定量値に基づいて、前記特定したタンパク質の前記各タンパ

ク質含有試料に含まれる含有量の比を求める工程と、を含むことを特徴とする。

【0005】

上記のタンパク質解析方法において、前記標識化合物としてO-メチル-L-イソウレアとその安定同位体を用いることが好適である。

上記のタンパク質解析方法において、前記同種のペプチド鎖の含有量比を求める工程で、前記修飾化合物によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖の2つのMSスペクトルのピークを比較する際に、天然に存在する同位体元素によるペプチド鎖の同位体ピークとの重なりを除去して定量比の補正をすることが好適である。

【発明の効果】

【0006】

本発明の請求項1に係るタンパク質分析方法によれば、簡単な処理でタンパク質の定量情報を得ることが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下に図面を参照して本発明の好適な実施形態を説明する。図1は、本実施形態のタンパク質解析方法の流れを示す説明図である。本実施形態のタンパク質解析方法は、タンデム型の質量分析計を用い、2種のタンパク質含有試料を対比して、それぞれの試料に含まれるタンパク質の同定及びそれぞれの試料に含まれる同種のタンパク質の量比を解析するというものである。

2種のタンパク質試料としては、例えば、同種の生体組織について、一つは健常状態のサンプルから採取したもの、もう一方は、疾病状態のサンプルから採取したもの等が想定される。そして、それらのタンパク質含有試料に含まれるタンパク質成分の発現量を定量比較する。

本実施形態のタンパク質解析方法の工程は、試料の前処理の工程(図1での混合試料を作成する段階まで)と、タンデム型質量分析計によって得たデータの解析の工程(図1でMSスペクトルによる含有量比の決定、MS/MSスペクトル及びデータベースによるタンパク質の同定の部分)とに大きく分けられる。

【0008】

試料の前処理の工程では、比較する2種のタンパク質含有試料の処理を行う。ここでの主な目的は、それぞれの試料に対し、同位体によって異なる質量数を持った標識化合物を標識し、質量差によってどちらの試料に由来するタンパク質であるか標識付けることにある。また、質量分析計によってタンパク質の1次構造を決定するためには、タンパク質成分をより短いペプチド鎖に切断する必要がある。

そこでまず初めに、2種のタンパク質含有試料(図1ではそれぞれ試料A、試料Bとした)について、試料中のタンパク質成分を制限酵素によって特定のアミノ酸部位で切断し、ペプチド鎖とし、元の試料からペプチド鎖含有試料を得る。ここで、ペプチド鎖とはアミノ酸の個数が数個から十数個のものを指す事とする。つまり、質量分析計によって分析可能な長さのものを指す。

【0009】

次にそれぞれのペプチド鎖含有試料に、質量差を有する標識化合物を修飾する。この標識化合物として、それを構成する元素の一部を同位体元素に変えることで質量数の異なる2つのものを用意する。図1では、ペプチド鎖含有試料Aに対し、軽い標識化合物、同じく試料Bに対し、重い標識化合物を修飾した場合を示している。

このようにして同位体標識したそれぞれのペプチド鎖含有試料を混合する。

【0010】

次にこうして得た混合試料を、液体クロマトグラフ及びタンデム型質量分析計によって分析を行う。本実施形態では、まず液体クロマトグラフによって、各ペプチド鎖毎に分離する。

そして、各ペプチド鎖は、タンデム型質量分析計へと送られ、第1の質量分析計でMSスペクトル、第2の質量分析計でMS/MSスペクトルが得られる。こうして得られたデ

ータの解析は以下のようにして行う。

各ペプチド鎖は、試料A由来のものと、試料B由来のものがあり、それぞれは、同位体標識によって一定の質量差を与えられている。そのため、上記のMSスペクトルデータでは、試料A由来のペプチド鎖のピークと、試料B由来のペプチド鎖のピークが分離して示される。これらの各ピーク高さ(または、ピーク面積等)を比較することで、このペプチド鎖の試料Aでの含有量と試料Bでの含有量との比を求めることができる。

【0011】

次に上記のペプチド鎖が何のタンパク質の一部であったかを特定するため、上記各ペプチド鎖のMS/MSスペクトルデータを解析する。このとき、上記MSスペクトルを参照して、測定した各ペプチド鎖の内、どのペプチド鎖についてタンパク質の特定を行うかを選択することができる。

選択されたペプチド鎖に対して、周知の解析技術によって、MS/MSスペクトルデータから各ペプチド鎖のアミノ酸配列を決定することができる。つまり、ペプチド鎖のアミノ酸配列に基づき、既知DNA配列を記憶した公知のデータベースによって、そのペプチド鎖に対応する遺伝子及びタンパク質を特定することができる。

上記でペプチド鎖の試料Aでの含有量と試料Bでの含有量との比は求められていたので、そのペプチド鎖に対応したタンパク質について、試料Aでの含有量と試料Bでの含有量との比が求められることとなる。

【0012】

以上が本実施形態の概略説明である。以下に、各工程について詳細に説明する。

まず、最初の工程では、2種類のタンパク質含有試料A、Bに対し、それぞれの試料を制限酵素によって特定のアミノ酸の部位で切断し、ペプチド鎖に断片化する。この制限酵素としては、Lys-C/Pを用い、リジンのC末端側で切断する。

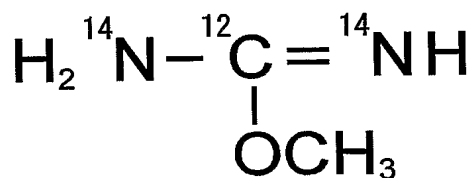
次の工程では、上記のようにペプチドに断片化した試料に対し、質量差を有する標識化合物を修飾することで、試料A、試料Bにそれぞれ含まれるペプチド鎖に質量差を持たせる。

標識化合物として下記の化学式(1)、(2)で表されるO-メチル-イソウレア(O-methyl-isourea)を用いる。

【0013】

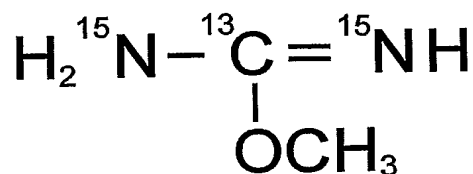
化学式(1)

【化1】



化学式(2)

【化2】

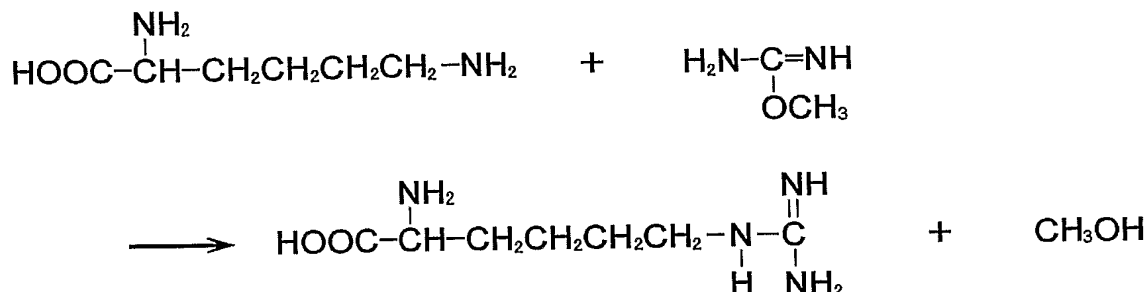


ここで、上記の化学式でC及びNの左肩の数字は、質量数を表している。つまり、重い標識化合物(化学式(2))は、軽い標識化合物(化学式(1))の質量数14の窒素原子N及びメチル基以外の質量数12の炭素原子Cを、それぞれ、質量数15の窒素原子N、質量数14の炭素原子Cという安定同位体に置き換えている。そのため、重い標識化合物(質量数45)と軽い標識化合物(質量数42)とでは3Daの質量差を持つことになる。

上記のO-メチル-イソウレアは下記の反応でリジン残基の部分と結合する。

【0014】

【化3】



そこで、軽い試薬で試料Aに含まれるペプチド鎖を、重い試薬で試料Bに含まれるペプチド鎖を、それぞれ同位体修飾する。その後、これらの同位体標識をした試料A、試料Bを混合する。

次に上記の混合試料を液体クロマトグラフ(LC)によって分離する。重い標識化合物と軽い標識化合物とは化学的性質には相違はない、つまり同種のペプチド鎖であれば試料A由来のものと試料B由来のものとは質量数以外に差がないため、LCによる分離では、同種の試料A由来のペプチド鎖と試料B由来のペプチド鎖とは同一のピークとして現れる。混合試料は、LCによる分離の後、質量分析計によって分析が行われる。

【0015】

本実施形態においては質量分析計として、四重極飛行時間型のタンデム型質量分析計(MS/MS)を用い、MSスペクトル及びMS/MSスペクトルを測定する。この装置構成としては、従来と同様なものを用いることができる。また、この他にもフーリエ変換質量分析計(FT-MS)も用いることが可能である。LCによって分離された混合試料は、ESI(エレクトロスプレーイオン化法)等で、ペプチド鎖がイオン化され、第1の質量分析計に送られる。第1の質量分析計で上記のイオンから特定の前駆イオンが選択され、第2の質量分析計へと送られる。この前駆イオンは、アルゴンガス等を照射されることでさらに小さいプロダクトイオンに断片化され、第2の質量分析計で検出される。このように、選択されたペプチドイオンに対して、それを断片化したプロダクトイオンの質量スペクトル(MS/MSスペクトル)が得られる。また、同時に、プロダクトイオンに断片化される前のペプチド鎖に対するMSスペクトルデータも得られる。

このようにして得られたMSスペクトルデータ及びMS/MSスペクトルデータは、コンピュータに保存され、以下のようなデータ処理によって試料に含まれているタンパク質の同定、2つの試料に含まれているタンパク質の相対比、が求められる。

【0016】

まず、MSスペクトルデータから、各ペプチド鎖について、試料A由来のものと、試料B由来のものと量の比を求めることができる。つまり、MSスペクトルの一つのペプチド鎖のピーク(試料A由来のもの)と、そのピークと3質量差離れた場所に現れるピーク(試料B由来のもの)と、を比較することによって、試料Aに含まれていたあるペプチド鎖の量と、試料Bに含まれていたそのペプチド鎖の量との相対比が求まることになる。

ただし、天然の元素の多くは、各元素に固有の安定同位体が存在する。このため、ある化合物の分子量も、その化合物を構成する各元素が、どの質量数の同位体をどのくらい含んでいるかによって、幾つかのピークが存在することになる。それぞれのピークの比は、化合物を構成する元素の同位体の天然の存在比から求めることが可能である。そこで、上記のようにして同定したタンパク質の試料Aと、試料Bとの定量比を比較するときには、この天然に存在する同位体ピークの分を考慮に入れ、天然の安定同位体によるピークの部分を引いておく必要がある。

【0017】

図2がその説明図である。図2(a)に示すように、MSスペクトルにおいて一つのペプチドのピークに(符号210a)は、それぞれ天然に存在する同位体のピーク(符号210b、210c、210d、210e、...)が付随する。図2(a)では、それらのピーク

クの内、最も質量数が低いものを実線で、他のものを点線で示した。

【0018】

一方、2種類のタンパク質試料A、Bをそれぞれ異なる質量数を持つ標識化合物O-メチルイソウレアで修飾したため、混合試料のMSスペクトルにおいて、軽い標識化合物で同位体標識したペプチドのピーク(符号210a)に対応して、質量数3だけ離れた位置に、重い標識化合物で同位体標識したペプチドのピーク(符号220)が現れることになる。そのため、軽い標識化合物でラベル化したペプチド鎖に付随する天然に存在する同位体のピークの一つ(図2(b)の符号210d)と、重い標識化合物でラベル化したペプチドのピーク(符号220)とが重なってしまう。そこで、符号220のピークから、符号210dのピークを差し引いて得たピーク高さ(符号240)と、符号210aのピーク高さ(符号230)とを比較することで、それぞれのピークで表されたペプチド鎖の量比が決定される。

ここでは、ピークの内最も質量数の小さいピークを基準として用いた場合を示したが、他の部分、例えば、ピーク高さが最も高いピークを基準として用いてもよい。

【0019】

次に、MS/MSスペクトルからは、各ペプチド鎖のアミノ酸配列が決定される。ここで、どのペプチド鎖に対してアミノ酸配列の特定を行うかは、上記のMSスペクトルによる情報をもとにして選択することができる。この選択は、解析の目的に応じて行えばよい。例えば、試料Aと試料Bとの間で異なる部分のみを解析したい場合、試料Aと試料Bとで含有量が異なるペプチド鎖に対してのみ解析を行えばよい。もちろん、同量のものについて解析を行っても、また、すべてのペプチド鎖に対して解析を行ってもよい。このように、どのペプチドを解析するかを選択できるため、効率よく試料の解析を行うことができる。

以上のようにしてペプチド鎖のアミノ酸配列が決定されれば、既知のDNA配列を記録した公知のデータベース検索ソフト(例えば、Masco t等)によって、そのアミノ酸配列と、既知タンパク質の遺伝子情報とが比較され、目的とするペプチド鎖に対応するタンパク質が同定できる。

【0020】

各ペプチド鎖に対する試料A、試料Bにおける含有量の比は、上記のようにMSスペクトルから求められているため、タンパク質自身の含有量の比もそのタンパク質に対応するペプチド鎖の含有量の比として求まることとなる。

このように、MS/MSスペクトルから両方の試料A、B中に含まれていたタンパク質を同定すると同時に、MSスペクトルからその相対量を決定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

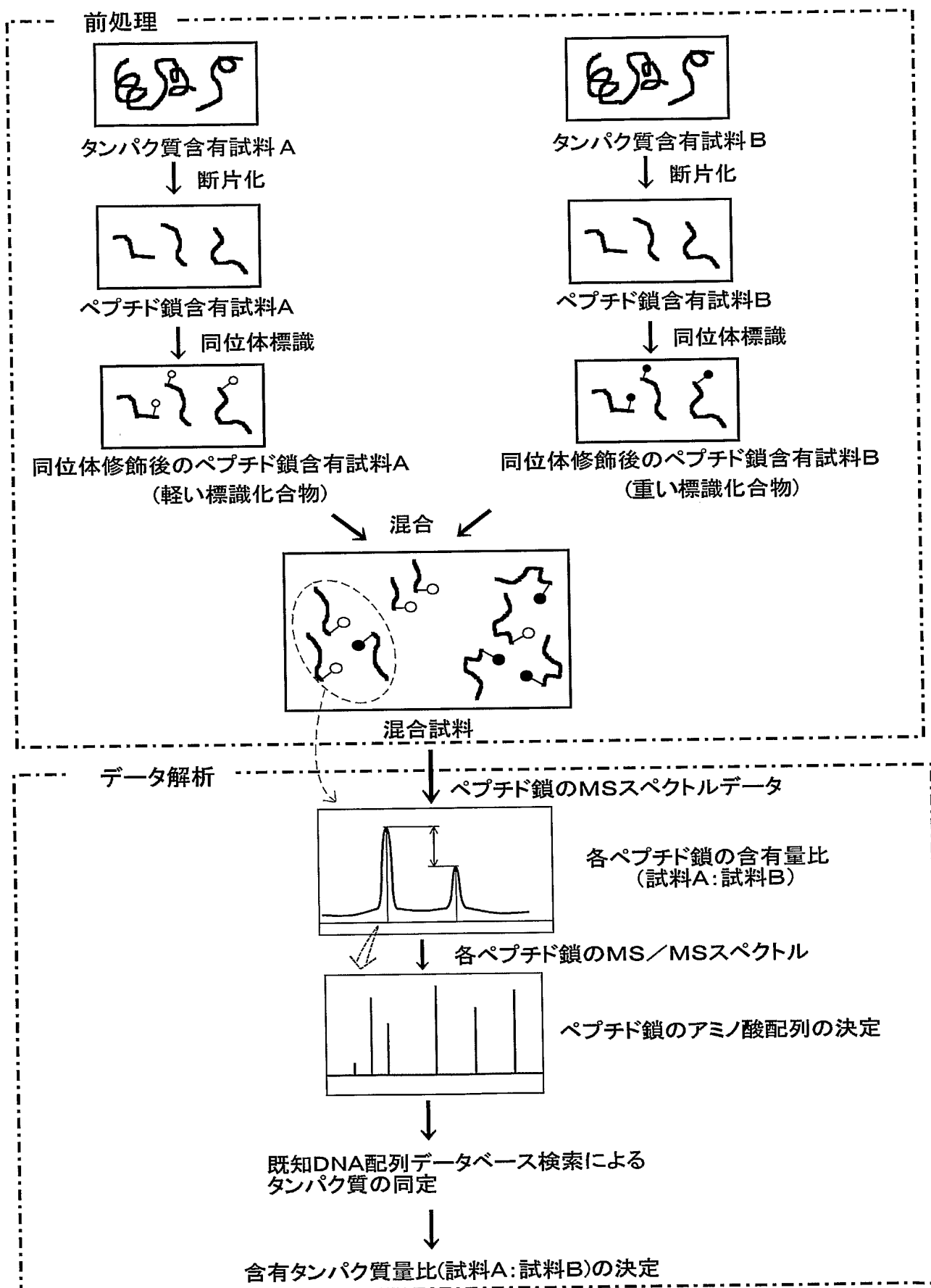
【図1】 本発明のタンパク質分析方法の説明図

【図2】 データ処理の説明図

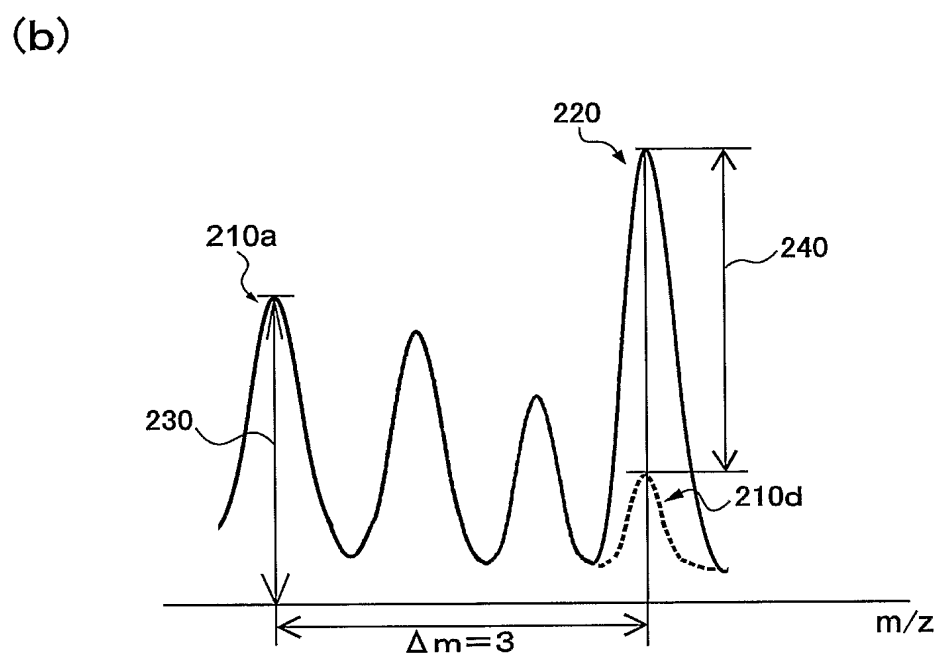
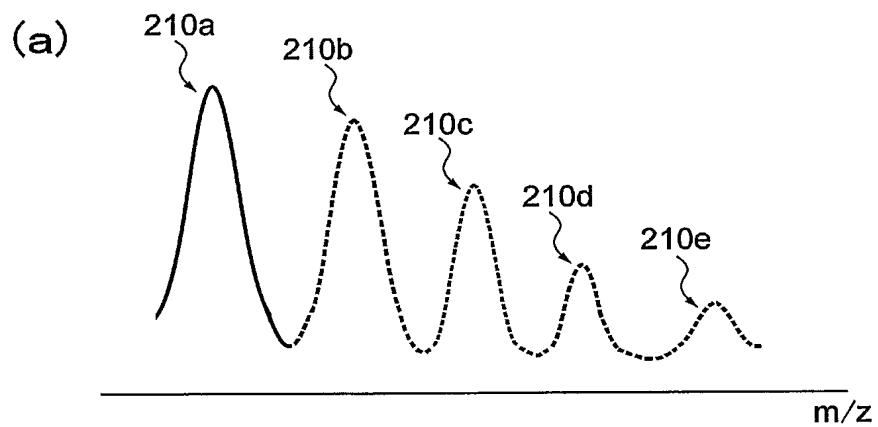


【書類名】 図面

【図1】



【図 2】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 本発明の目的はタンパク質の同定及びその定量情報をより簡単な処理で得ることのできるタンパク質解析方法を提供することにある。

【解決手段】 質量分析計を用い、2種のタンパク質含有試料を対比して、それぞれの試料に含まれるタンパク質の同定及びそれぞれの試料に含まれる同種のタンパク質の量比を解析するタンパク質解析方法において、前記2種のタンパク質含有試料をそれぞれ制限酵素により特定アミノ酸部位で切断し、ペプチド鎖含有試料とする工程と、同位体により異なる質量差を有する標識化合物を前記それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれるペプチド鎖に修飾し、それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれる同種のペプチド鎖に質量差を与える工程と、各同位体標識したペプチド鎖含有試料を混合し、該混合試料を各ペプチド鎖毎に分別定量してMSスペクトルを測定し、同位体標識によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖について含有量比を求める工程と、前記MSスペクトルを参照して、各ペプチド鎖からアミノ酸配列を特定すべきペプチド鎖を選択し、該ペプチド鎖から生成されるプロダクトイオンの質量スペクトルによって、該ペプチド鎖のアミノ酸配列を定性する工程と、前記ペプチド鎖のアミノ酸配列に基づき、既知DNA配列より対応するタンパク質を特定する工程と、前記同位体修飾したペプチド鎖の質量差による分別定量値に基づいて、前記特定したタンパク質の前記各タンパク質含有試料に含まれる含有量の比を求める工程と、を含むことを特徴とするタンパク質解析方法。

【選択図】 図1

特願 2003-419921

出願人履歴情報

識別番号 [301060163]

1. 変更年月日 2001年 9月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都日野市東豊田3-22-13 豊田第二コーポラス40

3

氏 名 山内 芳雄

特願 2003-419921

出願人履歴情報

識別番号

[301060174]

1. 変更年月日

2001年 9月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都八王子市みなみ野5-6-7

氏 名

磯辺 俊明

特願 2 0 0 3 - 4 1 9 9 2 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 4 6 4 6 2 0]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 2 月 1 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都八王子市下柚木 1 2 - 8 8

氏 名

新川 孝志